نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، ص. ۶۷۳-۶۶۱

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 3, July-August 2020, p. 661-673

مقاله علمی-پژوهشی

ارزیابی تأثیر نسبت‌های مختلف اجزاء کود زیستی بر انحلال پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens*

ساناز اشرفی سعیدلو[۱]- عباس صمدی[۲]- میرحسن رسولی صدقیانی[۳]*- محسن برین[۴]- ابراهیم سپهر[۵]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰

چکیده

افزایش سالانه‌ی قیمت کودهای شیمیایی پتاسیمی و نیز اثرات مخرب این کودها بر محیط‌زیست، اتخاذ راهکاری برای استفاده از پتاسیم بومی خاک را ضروری نموده است. استفاده از کودهای زیستی حاوی ریزجانداران سودمند از جمله این راهکارها محسوب می‌شود. این مطالعه با هدف مدل سازی و بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف ورمی‌کمپوست، فلوگوپیت و گوگرد بر میزان انحلال و آزادسازی پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* و ارائه سطوح مطلوب این متغیرها برای تهیه کود زیستی کارآمد انجام گرفت. بر این اساس تعداد ۲۰ آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ بر مبنای طرح مرکب مرکزی تعریف شد و اثر مقادیر مختلف متغیرهای ورمی‌کمپوست، کانی فلوگوپیت و گوگرد در چهار سطح کدبندی شده (α+، 1+، 0، 1- و α-) بر میزان انحلال پتاسیم بررسی گردید. نتایج نشان‌دهنده‌ی کارآمدی بالای (R^2 =۰/۹۴۹ و RMSE =۰/۸) مدل طرح مرکب مرکزی در برآورد انحلال پتاسیم بود. بر اساس نتایج، برهم‌کنش ورمی‌کمپوست با گوگرد ($p<$ ۰/۰۳۳۸) و برهم‌کنش فلوگوپیت با گوگرد ($p<$ ۰/۰۰۸۳) نسبتاً زیاد و معنی‌دار بود. نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی حاکی از اثر مثبت و افزاینده‌ی ورمی‌کمپوست (X_1) و اثر منفی و کاهنده فلوگوپیت (X_2) و گوگرد (X_3) بر افزایش انحلال پتاسیم بود. بطوری‌که با افزایش مقدار گوگرد از ۱۰/۲۵ به ۳۹/۷۵ درصد، انحلال پتاسیم تقریباً ۳۱/۶۱ درصد کاهش یافت. بر اساس پیش‌بینی شرایط بهینه برای انحلال پتاسیم، مقادیر ۴۱/۷۸ درصد ورمی‌کمپوست، ۲۴/۳۵ درصد فلوگوپیت و ۱۰/۲۵ درصد گوگرد منجر به بیشترین انحلال پتاسیم (۱۰۹/۲۷ میلی‌گرم بر لیتر) توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس* می‌شود.

واژه‌های کلیدی: مدل‌سازی، کود زیستی، ورمی‌کمپوست، روش سطح پاسخ

مقدمه

تغذیه جمعیت در حال افزایش جهان نیازمند کشاورزی متراکم و پایدار و افزایش قابل‌توجه تولیدات کشاورزی است. با این حال، تولید مواد غذایی در کشاورزی عموماً نمی‌تواند پایدار باشد، مگر این‌که عناصر غذایی به دلیل افزایش تولید محصول از خاک خارج شوند. با توسعه کشاورزی متراکم و معرفی ارقام با عملکرد بالا و هیبریدها در طول انقلاب سبز، عناصر غذایی پرمصرف خاک از جمله پتاسیم با سرعت بالایی تخلیه می‌شوند. به‌طوری‌که بسیاری از خاک‌های کشاورزی فاقد مقادیر کافی از یک یا چند عنصر غذایی ضروری برای گیاه هستند و کمبود نیتروژن، فسفر و پتاسیم قابل‌دسترس گیاه، فاکتورهای اصلی محدودکننده برای تولید مواد غذایی در بسیاری از خاک‌های کشاورزی محسوب می‌شوند (۵۰). لذا برای جلوگیری از این مشکل و به دست آوردن عملکردهای بالاتر، کشاورزان به‌طور افزاینده‌ای به منابع کودهای شیمیایی وابسته شده‌اند (۲۱). علی‌رغم اینکه کودهای شیمیایی به رشد گیاه کمک می‌نمایند، تأثیری در بهبود خواص خاک ندارند و استفاده مداوم از آن‌ها اثرات مخربی بر محیط‌زیست دارد (۱). از این‌رو، کاهش استفاده از مواد شیمیایی در تولید محصولات کشاورزی سالم، به عنوان اولویت بسیار مهم در تحقیقات امروزی درنظر گرفته شده است.

کودهای زیستی[۶] یکی از مهم‌ترین ارکان کشاورزی ارگانیک یا آلی[۷] و پایدار[۸] را تشکیل می‌دهند که استفاده صحیح و مناسب از آن‌ها

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به‌ترتیب دانشجوی دکتری علوم خاک، استادان، استادیار و استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(*- نویسنده مسئول: (Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir
DOI: 10.22067/jsw.v34i3.82161

6- Biofertilizer
7- Organic Farming
8- Sustainable Agriculture

می‌تواند ضمن افزایش عملکرد کمی و کیفی محصولات کشاورزی و کاهش مصرف بخش قابل‌توجهی از انواع کودهای شیمیایی، حفظ محیط زیست را نیز به دنبال داشته باشد. این کودها حاوی فرمولاسیونی از ریزجانداران زنده (باکتری‌ها و قارچهای سودمند) یا متابولیت‌های تولیدی آن‌ها می‌باشند که از طریق روش‌هایی مانند تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات، رهاسازی پتاسیم، تأمین آهن و دیگر عناصر به بهبود تغذیه گیاه کمک نموده و علاوه بر آن با کاهش بیماری‌ها، بهبود ساختمان خاک و سایر اثرات مفید باعث تحریک بیشتر رشد گیاه شده و افزایش کمیت و کیفیت محصول را به دنبال دارند (۵). علاوه بر موارد ذکر شده، این ریزجانداران می‌توانند ضمن برقراری ارتباط همزیستی با ریشه‌های گیاهان، توانایی آن‌ها را در جذب آب و مواد غذایی افزایش داده و مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده را به‌میزان قابل ملاحظه‌ای بهبود بخشند. کودهای زیستی نیتروژنی و فسفاتی در بخش کشاورزی دارای بیشترین استفاده هستند. جنس و گونه‌های رایج PGPRای رایج و غالب به کار برده شده در تولید این نوع کودها، عمدتاً شامل جنس های *سودوموناس*، *باسیلوس*، *آزوسپیریلوم* و *ازتوباکتر* می‌باشند (۳۶). استفاده از عنصر گوگرد در فرمولاسیون کودهای میکروبی باعث افزایش اثرات محرک رشدی آن بر روی گیاه شده و لذا به نظر می-رسد این عنصر بایستی به عنوان بخش ثابت، در فرمولاسیون کودهای میکروبی در نظر گرفته شود (۲۴). البته ممکن است اثر گوگرد در کود میکروبی با توجه به ریزجاندار به کار برده شده متفاوت باشد ولی در کل بایستی بیان نمود که کاربرد گوگرد به دلیل اثرات مستقیم (اثر تغذیه‌ای بر گیاه) و غیر مستقیم (تأثیر بر قابلیت دسترسی عناصر غذایی از طریق کاهش pH) در فرمولاسیون کود میکروبی می‌تواند کاملاً مفید باشد. اکسیداسیون گوگرد عنصری از طریق کاهش pH موجب بهبود حلالیت عناصر نامحلول در خاک‌های آهکی شده و افزایش جذب عناصر توسط گیاه را به دنبال دارد (۱۱). لذا کاربرد گوگرد در کنار باکتری‌های حل‌کننده‌ی عناصر غذایی مختلف، نه تنها باعث اصلاح خواص خاک و افزایش عملکرد محصولات زراعی می‌گردد، بلکه موجب افزایش راندمان کودهای کم‌مصرف نیز می‌شود (۱۲). خوشرو و همکاران (۲۴) در مطالعه‌ای تأثیر کاربرد و عدم کاربرد گوگرد را در فرمولاسیون کود میکروبی فسفاته *سودوموناس فلورسنس* را بررسی کرده و گزارش نمودند که افزودن گوگرد نه تنها اثر منفی بر باکتری *سودوموناس فلورسنس* مورد استفاده در فرمولاسیون کود میکروبی نداشته بلکه اثر مثبت این کود را تشدید نموده است.

ورمی‌کمپوست نیز که محصول نهایی فرآیند تجزیه مواد آلی در حضور کرم‌های خاکی کمپوست‌ساز می‌باشد، به دلیل کاهش سطح آلاینده‌ها و داشتن سطح بالای جمعیت میکروبی و عناصر غذایی، در حال حاضر به عنوان یکی از بهترین کودهای زیستی مطرح است (۳۵). در طی فرآیند تولید ورمی‌کمپوست قسمت عمده‌ی ماده آلی به صورت دی اکسید کربن، آمونیاک و آب، معدنی می‌شود و بخش باقی‌مانده نیز به مواد رسیده و پایدار تبدیل می‌گردد که از لحاظ شیمیایی به مواد هیومیک خاک شباهت زیادی دارد (۱۰). مواد هیومیک به طور مستقیم نقش مهمی در انتشار آهسته مواد مغذی و بهبود ظرفیت تبادل کاتیونی، pH، ظرفیت بافری و بسیاری از واکنش های دیگر دارند (۳۸). اخیراً غنی‌سازی ورمی کمپوست با باکتری‌های حل‌کننده عناصر غذایی مورد توجه قرار گرفته است (۲). افزایش جمعیت میکروبی، افزایش اسید هیومیک و کاهش pH، کاهش نسبت C:N در ورمی‌کمپوست غنی‌شده با تیمارهای باکتریایی گزارش شده است (۱۵، ۲۳).

بعد از نیتروژن و فسفر، پتاسیم مهم‌ترین عنصر غذایی است که در رشد، متابولیسم و توسعه گیاهان نقش کلیدی ایفا می‌کند (۳). اگرچه پتاسیم به وفور در خاک وجود دارد، اما تنها ۱ تا ۲ درصد آن برای گیاهان قابل دسترس می‌باشد. بسته به نوع خاک، ۹۰ تا ۹۸ درصد پتاسیم خاک در ساختار کانی‌های مختلفی نظیر فلدسپار (اورتوکلاز و میکروکلین) و میکا (بیوتیت و موسکویت) قرار دارد. ۱ تا ۱۰ درصد پتاسیم خاک نیز به شکل غیرتبادلی بین لایه‌های انواع مشخصی از کانی‌های رسی قرار گرفته است (۴۴). غلظت پتاسیم محلول، که به‌صورت مستقیم توسط گیاهان و میکروب‌ها در خاک جذب شده و در معرض آبشویی نیز قرار می‌گیرد، در خاک‌های زراعی بین ۲ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر متغیر است (۴۳). مصرف نامتعادل کودهای شیمیایی، افزایش قابل توجه عملکرد محصولات (تخلیه پتاسیم محلول خاک) و تخلیه پتاسیم در سیستم خاک باعث شده که مقادیر بالایی از پتاسیم در خاک به شکل تثبیت شده وجود داشته باشد. در نتیجه کمبود پتاسیم در بسیاری از گیاهان گزارش شده است (۲۷ و ۴۹). افزایش سالانه‌ی قیمت کودهای شیمیایی پتاسیمی (۴۷۰ دلار به ازای هر تن از سال ۲۰۱۱) و نیز اثرات مخرب این کودها بر محیط‌زیست، پیدا کردن راهکاری برای استفاده از پتاسیم بومی خاک را ضروری نموده است (۲۷). مطالعات حاکی از آن هستند که میکروارگانیسم‌های مفید خاک شامل باکتری‌های ساپروفیت، قارچها و اکتینومیست‌ها قادرند از طریق تولید اسیدهای آلی و معدنی، پلی ساکاریدها، کلات‌سازی و واکنش‌های تبادلی منجر به انحلال پتاسیم نامحلول خاک‌ها شوند (۹، ۱۸). در بین این میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌ها از اهمیت زیادی برخوردار بوده و می‌توانند به‌شکل مؤثری ذخایر معدنی و نامحلول پتاسیم کل خاک را حل نمایند (۶، ۳۲ و ۳۷).

فعالیت‌های متابولیکی ریزجانداران و در نتیجه توانایی انحلال پتاسیم توسط آن‌ها تحت تأثیر متغیرهای فیزیکی و شیمیایی گوناگونی نظیر منابع کربن و نیتروژن، دما، طول دوره انکوباسیون، pH، شرایط تهویه، نوع و مقدار کانی است (۴۷). امروزه، برای تشخیص شرایط بهینه برای فعالیت متابولیکی باکتری‌ها از روش‌های

آماری نظیر روش سطح پاسخ (RSM) [1] به‌عنوان ابزار مفیدی برای مدل‌سازی کمی اثر توأم تعدادی متغیر در برخی فرایندهای میکروبی جهت نیل به حداکثر کارآیی این ریزجانداران استفاده می‌شود (۴۵). RSM به عنوان یکی از روش‌های مدل‌سازی تجربی مطرح است (۱۴). این روش مجموعه‌ای از روش‌های ریاضی است که رابطه‌ی بین یک یا چند متغیر پاسخ را با چندین متغیر مستقل (مورد مطالعه) تعیین می‌کند (۴۸). در این روش سعی می‌شود با استفاده از یک طرح آزمایش مناسب، راهی برای تخمین برهم‌کنش‌ها، اثرات درجه دوم و حتی شکل موضعی سطح پاسخ مورد مطالعه یافته شود. در این میان اهداف خاصی به‌طور جدی دنبال می‌شوند که از مهم‌ترین‌شان می‌توان به بهبود فرآیند با یافتن ورودی‌های بهینه، رفع مشکلات و نقاط ضعف فرآیند و پایدارسازی آن اشاره کرد (۴).

اگرچه باکتری‌های حل‌کننده پتاسیم می‌توانند به عنوان تکنولوژی جایگزین در انحلال اشکال نامحلول پتاسیم عمل نمایند، اما عدم آگاهی کشاورزان در مورد کودهای زیستی و تأثیر آهسته کودهای میکروبی پتاسیمی بر عملکرد گیاه، تمایل محققان به توسعه تکنولوژی کودهای زیستی پتاسیمی را کاهش داده و کاربرد آن‌ها را در کشاورزی محدود نموده است (۱۸). از این‌رو، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر نسبت‌های مختلف ورمی‌کمپوست، فلوگوپیت (منبع پتاسیم) و گوگرد بر میزان انحلال و آزادسازی پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* و ارائه سطوح مطلوب این متغیرها برای تهیه کود میکروبی کارآمد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مایه تلقیح

باکتری *Pseudomonas fluorescens* از بانک میکروبی گروه علوم خاک دانشگاه ارومیه تهیه شد و در محیط کشت جامد نوترینت آگار [2] (NA) بازکشت گردید. پس از گذشت ۴۸ ساعت از رشد باکتری، یک لوپ از کشت تازه جدایه به درون ارلن حاوی ۲۵ میلی لیتر محیط نوترینت براث [3] (NB) مایه‌زنی و سپس به مدت ۲۴ ساعت در شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تکان داده شد. برای تلقیح محیط اصلی مایه تلقیح، ۲ میلی‌لیتر از محیط کشت دارای باکتری، به درون ارلن ۲۵۰ میلی لیتری که حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط NB بود، مایه‌زنی و جهت یکنواخت شدن به مدت ۲۴ ساعت با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تکان داده شد.

آماده‌سازی نمونه‌ها و اندازه‌گیری پتاسیم محلول

ابتدا ورمی‌کمپوست، فلوگوپیت و گوگرد از الک ۱۴۰ مش عبور داده شدند. ظرفیت نگهداشت آب آن‌ها تعیین گردید، به طوری که مقدار ۱۰۰ گرم از هر یک از مواد فوق‌الذکر داخل سیلندرهایی که در انتهای آن‌ها صافی پارچه‌ای قرار داشت ریخته شد و تا اشباع کامل نمونه‌ها، آب به آن‌ها اضافه گردید در ادامه نمونه‌ها به مدت یک شب به حال خود رها شدند تا آب اضافی خارج گردد. هر یک از سیلندرها پس از توزین، به آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و پس از ۲۴ ساعت مجدداً توزین انجام گرفت و در نهایت مقدار آب لازم برای خیس کردن نمونه‌ها با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید (۴۲). در ادامه بر اساس طرح آزمایشی ارائه شده توسط نرم‌افزار مقادیر مختلفی از هر یک از این مواد با هم ترکیب و تعداد ۲۰ نمونه آماده شده (جدول ۲) و در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شدند (۴۲). در پایان مقدار آب استریل مورد نیاز تعیین شده برای هر نمونه، همراه با ۱ میلی‌لیتر مایه تلقیح باکتریایی (با جمعیت حدود $2/49\times10^{8}$ سلول باکتری در هر میلی‌لیتر از محلول در جذب نور (۱/۵۶) با طول موج ۶۰۰ نانومتر) داخل هر بسته ریخته و دهانه بسته‌ها پرس گردید. نمونه‌ها به مدت ۲ ماه در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. در پایان زمان آزمایش، به منظور اندازه‌گیری مقدار پتاسیم محلول، مقدار ۲/۵ گرم از هریک از نمونه‌ها همراه با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر (با نسبت ۱:۲۰) به مدت ۳۰ دقیقه تکان داده شد و پس از ۲۴ ساعت عمل تکان دادن مجدداً تکرار گردید. نمونه‌ها پس از سانتریفیوژ با استفاده از کاغذ صافی واتمن (شماره ۴۱) صاف شده و در عصاره‌های بدست آمده مقدار پتاسیم با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر مدل Corning 480 قرائت شد (۱۶).

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{(W_1 - W_2)\times 100\%}{W_2} \qquad (۱)$$

که W_1 و W_2 در آن به‌ترتیب نشان‌دهنده‌ی وزن نمونه قبل از آون و پس از خشک شدن در آون می‌باشند.

مدل‌سازی انحلال پتاسیم

بمنظور مدل‌سازی و نیز ارزیابی تأثیر مقادیر متغیرهای مؤثر بر میزان انحلال پتاسیم توسط باکتری *Pseudomonas fluorescens* از طرح مرکب مرکزی استفاده شد. طراحی آزمایش‌ها با ترکیب مقادیر مختلف هر یک از متغیرهای مستقل با استفاده از روش سطح پاسخ و بر مبنای طرح مرکب مرکزی انجام شد. دامنه‌ی متغیرهای مورد نظر شامل مقادیر ورمی‌کمپوست، فلوگوپیت و گوگرد، بر اساس مقادیر

1- Response Surface Methodology (RSM)

2- Nutrient Agar

3- Nutrient Broth

واقعی و همچنین مقادیر کد شده (α+، ۱+، ۰، ۱−، α−) در جدول ۱ ارائه شده است. با توجه به جدول ۱ مقدار x_0 برای متغیرهای ورمی کمپوست، فلوگوپیت و گوگرد به ترتیب برابر با ۲۸، ۴۵ و ۲۵ درصد بود. لازم به ذکر است که تجزیه تحلیل‌های مربوط به طرح مرکب مرکزی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 10 صورت گرفت.

نتایج و بحث

به‌منظور مطالعه‌ی برهم‌کنش‌های بین متغیرهای ورمی‌کمپوست، فلوگوپیت و گوگرد و نیز تعیین سطوح بهینه‌ی این متغیرها، جهت دستیابی به بیشترین انحلال پتاسیم توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس* از طرح مرکب مرکزی استفاده گردید. طرح آزمایشی و نتایج حاصل، در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج، بیشترین انحلال پتاسیم (۱۱۷/۲ میلی‌گرم در لیتر) مربوط به سطوح ۱− فلوگوپیت و گوگرد، و سطح ۱+ ورمی‌کمپوست بود (آزمایش ۱۵، جدول ۲).

جدول ۱- دامنه مقادیر متغیرهای مورد مطالعه در مدل‌سازی

Table 1- Range of studied variables amounts in modeling

متغیر مستقل Independent variable	مقدار کد شده‌ی متغیر Coded amount of variable	دامنه و مقادیر Range and amounts				
	X_i	+α	+1	0	-1	-α
ورمی‌کمپوست (درصد) (Vermicompost (%))	X_1	51	41.57	28	14.43	5
فلوگوپیت (Phlogopite (%))	X_2	80	65.65	45	24.35	10
گوگرد (درصد) (Sulfur (%))	X_3	50	39.75	25	10.25	0

جدول ۲- ماتریس مقادیر متغیرهای کد شده در مدل‌سازی روش طرح مرکب مرکزی

Table 2 – Matrix of coded variables amounts in central composite design modeling

شماره آزمایش Experiment number	مقادیر کدشده‌ی متغیرها Amounts of coded variables)			غلظت پتاسیم Potassium concentration ($mg.l^{-1}$)
	ورمی‌کمپوست Vermicompost	Phlogopite فلوگوپیت	گوگرد Sulfur	
1	1	1	-1	82.63
2	1	-1	1	70.29
3	0	0	0	67.82
4	-1	-1	1	43.13
5	0	0	0	70.29
6	-1	1	-1	33.26
7	0	0	0	72.76
8	0	1.68	0	67.82
9	0	0	0	67.82
10	0	0	1.68	45.60
11	0	-1.68	0	72.76
12	1.68	0	0	72.76
13	1	1	1	70.29
14	-1	-1	-1	62.88
15	1	-1	-1	117.2
16	0	0	-1.68	80.16
17	-1	1	1	38.20
18	-1.68	0	0	20.92
19	0	0	0	67.82
20	0	0	0	62.88

جدول ۳- ضرایب تابع چندجمله‌ای طرح مرکب مرکزی برای پیش‌بینی غلظت پتاسیم حل شده

Table 3– Coefficients of central composite design multi variable function for predicting dissolved potassium

بخش مدل Part of model	پارامترهای مدل Model parameters	ضریب Coefficient	آماره *F* (*F*-Value)	آماره *p* (*p*-Value)
ثابت مدل Constant of model		68.07	20.88	<0.0001
خطی Linear	Vermicompost	18.31	112.1	<0.0001
	Phlogopite	-5.66	10.74	0.0083
	Sulfur	-9.67	31.31	0.0002
درجه دو Second order	Vermicompost × Vermicompost	-6.46	14.72	0.0033
	Phlogopite × Phlogopite	1.83	1.18	0.3024
	Sulfur × Sulfur	-0.787	0.22	0.6501
برهم‌کنش Interaction	Vermicompost × Phlogopite	0.000125	3.059E-009	1.0000
	Vermicompost × Sulfur	-5.54	6.04	0.0338
	Phlogopite × Sulfur	7.41	10.74	0.0083

ضرایب تابع چندجمله‌ای به همراه آماره‌های p و F با استفاده از طرح مرکب مرکزی در جدول ۳ نشان داده شده‌اند. در بخش خطی، اثر تمام متغیرهای مورد مطالعه ($p < 0.001$) بر مقدار انحلال پتاسیم معنی‌دار بود. در بخش درجه دو نیز علی‌رغم اثر غیرمعنی‌دار فلوگوپیت و گوگرد، ورمی‌کمپوست تأثیر معنی‌داری بر انحلال K توسط باکتری داشت. در ارتباط با اثرات متقابل متغیرهای مستقل، با توجه به مقادیر آماره p، برهم‌کنش ورمی‌کمپوست با گوگرد ($p < 0.0338$) و برهم کنش فلوگوپیت با گوگرد ($p < 0.0083$) نسبتاً زیاد و معنی‌دار است (جدول ۳).

با توجه به نتایج جدول ۳ و با در نظر گرفتن متغیرهای دارای اثر معنی‌دار بر انحلال K، تابع پیش‌بینی‌کننده مقدار پتاسیم حل شده توسط باکتری بر اساس مقدار کد شده‌ی متغیرهای مستقل به‌صورت معادله (۲) قابل ارائه است.

$$\text{Dissolved K (mg.l}^{-1}) = 68.07 + 18.31X_1 - 5.67X_2 - 9.68X_3 - 5.54X_1X_3 + 7.41X_2X_3 - 6.46 X_1^2 \quad (۲)$$

$R^2 = 0.949$ $\quad R^2_{adj} = 0.904$

در این معادله X_1، X_2 و X_3 به‌ترتیب مربوط به مقادیر کد شده ورمی‌کمپوست، فلوگوپیت و گوگرد می‌باشند. معادله ۲ که بر مبنای نتایج تحلیل آماری ضرایب مدل طرح مرکب مرکزی خلاصه شده است، حاکی از اثر مثبت و افزاینده ورمی‌کمپوست (X_1) و اثر منفی و کاهنده فلوگوپیت (X_2) و گوگرد (X_3) بر انحلال پتاسیم هستند. در شکل ۱ به منظور ارزیابی کارایی مدل حاصل از طرح مرکب مرکزی، مقدار پتاسیم اندازه‌گیری شده در آزمایش‌های طرح مرکب مرکزی در مقابل میزان پتاسیم پیش‌بینی شده با مدل طرح مرکب مرکزی رسم شده است. این شکل به‌روشنی نشان می‌دهد که مدل طرح مرکب مرکزی با دقت قابل قبولی (RMSE = ۰/۸۰ و R^2 = ۰/۹۴۹) مقدار پتاسیم را در آزمایش‌های ۲۰ گانه برآورد نموده است. بر اساس مقدار R^2، می‌توان گفت که ۹۴/۹ درصد از تغییرات انحلال پتاسیم توسط باکتری با استفاده از این مدل قابل تبیین است.

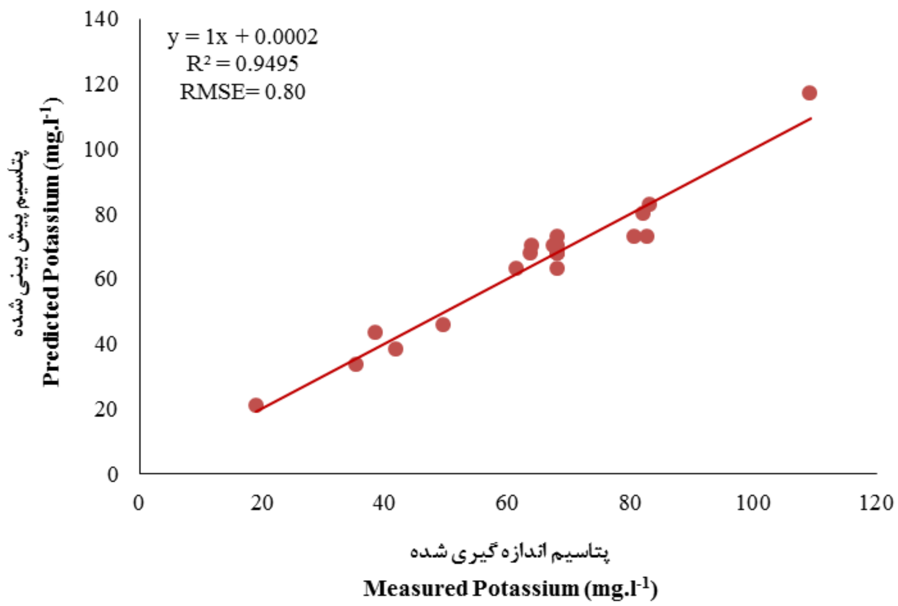
به‌منظور تفسیر بهتر نتایج مدل و رتبه‌بندی اثر پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی در معادله ۱، درصد اثر هر یک از این پارامترها با استفاده از تحلیل پارتو[1] و با کاربرد معادله ۳ محاسبه گردید (۳).

$$P_i = \left[\frac{\beta_i^2}{\sum \beta_i^2}\right] \times 100 \qquad i \neq 0 \quad (۳)$$

که در آن؛ P_i درصد اثر هر یک از متغیرهای طرح مرکب مرکزی و β_i نیز ضرایب معادله چندجمله‌ای (جدول ۳) است. درصد اثر هر یک از پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی در شکل ۲ نشان داده شده است. از بین متغیرهای مستقل بررسی شده به‌ترتیب ورمی‌کمپوست، گوگرد، برهم‌کنش بین فلوگوپیت و گوگرد و توان دوم ورمی‌کمپوست بیشترین تأثیر را بر میزان انحلال پتاسیم مشاهده‌ای دارند. به‌طوری که درصد اثر این ۴ متغیر به‌ترتیب برابر با ۵۶/۶۲، ۱۵/۷۹، ۹/۲۷ و ۷/۰۵ بوده و مجموع درصد اثرات این ۴ متغیر نیز برابر با ۸۳/۷۳ درصد است.

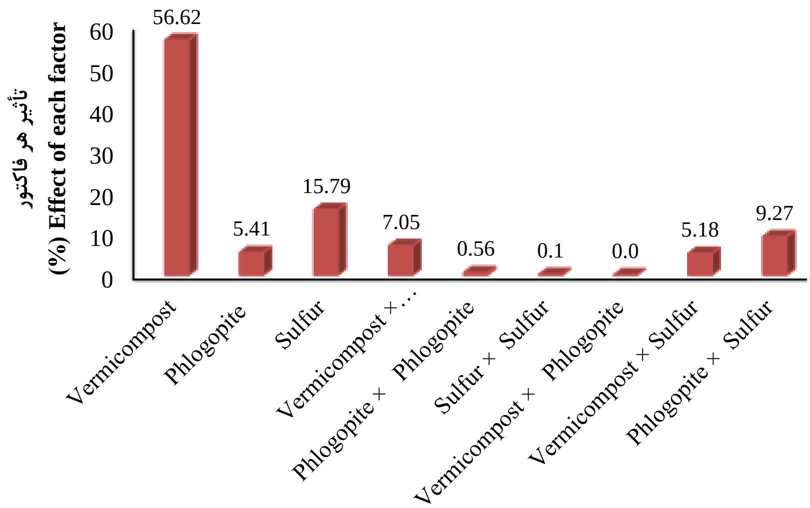
اثر توأم متغیرها بر انحلال پتاسیم توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس* با استفاده از نمودارهای سه بعدی رسم شد (شکل ۳). در این نمودارها تأثیرات دو متغیر به‌طور همزمان نشان داده شده و متغیر سوم در سطح مرکزی خود ثابت نگه داشته شده است. شکل ۳ الف نشان‌دهنده‌ی اثر ترکیبی ورمی‌کمپوست و فلوگوپیت بر مقدار انحلال پتاسیم در حضور مقدار ۲۵ درصد گوگرد (سطح مرکزی، کد برابر با صفر) است.

1- Pareto analysis



شکل ۱- غلظت‌های اندازه‌گیری شده و پیش‌بینی شده پتاسیم حل شده با استفاده از مدل طرح مرکب مرکزی

Figure 1– Measured and predicted concentration of dissolved potassium by central composite design model



شکل ۲- نتایج تحلیل پارتو برای مقایسه اثر پارامترهای مدل طرح مرکب مرکزی بر انحلال پتاسیم

Figure 2 –Pareto analysis results for comparison of the effects of central composite design parameters on potassium dissolution

همانطورکه در شکل مشاهده می‌شود، افزایش ورمی‌کمپوست باعث افزایش قابل توجه میزان انحلال پتاسیم می‌شود. افزایش فلوگوپیت منجر به تغییرات محسوسی در مقدار انحلال پتاسیم نشده است. بر اساس نتایج بدست آمده، میزان انحلال پتاسیم در حضور مقادیر مختلف گوگرد نیز متفاوت است. بطوری‌که با افزایش مقدار گوگرد از ۱۰/۲۵ درصد به ۳۹/۷۵ درصد، انحلال پتاسیم تقریباً ۳۱/۶۱ درصد کاهش یافته است (شکل ۳ ب و پ).

تجزیه کانی‌ها در اثر کاهش pH محیط (به دلیل تولید اسیدهای آلی)، تشکیل کمپلکس با کاتیون‌های سطحی کانی (به واسطه اسیدهای آلی و سیدروفور تولید شده) و پلی‌ساکاریدهای تولید شده

توسط باکتری‌ها که به طور غیرمستقیم در آزادسازی عناصر نقش دارند از مکانیسم‌های اصلی باکتری‌ها در رهاسازی پتاسیم محسوب می‌شوند. پلی ساکاریدها، اسیدهای آلی و سیدروفورها را به شدت جذب کرده و منجر به تشکیل غلظت بالایی از اسیدهای آلی و سیدروفورها در نزدیکی سطح کانی شده و با اکسید سیلیسیم موجود در سطح کانی کمپلکس ایجاد می‌نمایند، به این ترتیب عناصر از سطح کانی آزاد شده و وارد محیط کشت محلول می‌شوند، از طرفی پلی ساکاریدهای موجود در محیط کشت با جذب سیلیسیم باعث به هم خوردن تعادل سیلیسیم بین کانی و فاز مایع می‌شوند و از این طریق منجر به آزاد شدن عناصری نظیر پتاسیم و آهن می‌گردند (۲۵ و ۲۶). توانایی سویه‌ها برای کاهش pH محیط به‌عنوان شاخصی از اسیدی نمودن محیط در نظر گرفته می‌شود. به‌عبارت دیگر، فرض می‌شود میکروارگانیسم‌های حل‌کننده پتاسیم[1] که پتاسیم نامحلول را حل می کنند، قادرند مقادیر قابل‌توجهی از اسیدهای آلی را تولید نمایند. اسیدهای آلی ناشی از فعالیت متابولیکی میکروارگانیسم‌ها منجر به کاهش pH شده و از طریق افزایش اسیدیته کل، ظرفیت آزادسازی کاتیون‌هایی نظیر پتاسیم را افزایش می‌دهند (۸، ۴۰). این مطلب بر اساس یافته‌های چندین محقق استوار است که گزارش نمودند، KSMs، اسیدهای آلی مونو، دی و تری نظیر گلوکونیک، استیک، اگزالیک، فوماریک، تارتاریک و سیتریک تولید می‌کنند و برای تأمین نیاز خود به Si^{4+} و K^+، ساختار کانی را شکسته و این یون‌ها را وارد فاز محلول نموده و از این طریق منجر به کاهش pH می‌شوند (۲۰، ۲۲ و ۲۷). تولید H^+ در طول هیدرولیز کانی موجود در ترکیب کود نیز دلیل دیگر کاهش pH می‌باشد (۲۸). علی‌رغم تأثیر مثبتی که کاهش pH در افزایش قابلیت انحلال عناصر نامحلول دارد با توجه به این که محدوده بهینه pH برای باکتری‌هایی نظیر سودوموناس‌ها و باسیلوس‌ها ۵ تا ۸ است لذا کاهش pH به کمتر از آستانه‌ی تحمل باکتری‌ها منجر به کاهش کارآیی آن‌ها خواهد شد (۱۷). با توجه به این‌که گوگرد عنصری، خاصیت اسیدزایی دارد لذا منجر به کاهش pH می‌گردد (۲۹). بنابراین کاهش میزان انحلال پتاسیم در اثر افزایش مقدار گوگرد می‌تواند ناشی از آن باشد که گوگرد pH را به کمتر از آستانه تحمل باکتری کاهش داده و درنتیجه رشد باکتری‌ها متوقف و به این ترتیب میزان رهاسازی پتاسیم توسط آن‌ها کاهش یافته است (۲۵). اشرفی و همکاران (۷) اثر ریزجانداران حل‌کننده سیلیکات بر آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار را بررسی کرده و گزارش نمودند که تلقیح میکروبی منجر به افزایش رهاسازی پتاسیم شد و پتاسیم محلول در نمونه‌های تلقیح‌یافته با *Bacillus* sp. و *Aspergillus niger* به‌ترتیب ۹۲/۳ و ۹۲/۸ درصد نسبت به نمونه‌های شاهد افزایش یافت. نتایج پژوهش بین (۱۳) نیز نشان داد که میزان پتاسیم آزاد شده از فلدسپار و ایلایت در اثر تلقیح باکتری در محیط کشت به ترتیب ۸ و ۱۶ درصد افزایش یافت. احتمال داده می شود واکنش‌هایی نظیر تولید اسید، تشکیل کمپلکس توسط پلی ساکاریدهای برون‌سلولی و تغییر و تبدیلات آنزیمی در آزادسازی پتاسیم از کانی‌ها دخیل باشند.

مطالعات نشان دادند که عوامل مختلفی از قبیل منابع کربن و نیتروژن، دما، pH، شرایط تهویه و دوره انکوباسیون در کارآیی حل‌کننده‌های پتاسیم نقش دارند (۳۳ و ۴۶). با توجه به این‌که کربن یکی از منابع غذایی اولیه برای رشد و فعالیت متابولیکی ریزجانداران تلقیح شده می‌باشد و وجود آن برای تولید اسیدهای آلی ضروری است لذا تعیین منبع کربنی مناسب برای میکروارگانیسم‌های حل‌کننده حائز اهمیت می‌باشد (۱۹، ۳۴ و ۳۹). ورمی‌کمپوست که حاوی محتوای کربن و عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف بالایی می‌باشد از طریق عرضه مقادیر بالایی از عناصر غذایی، رشد و فعالیت‌های متابولیکی میکروارگانیسم‌ها را افزایش داده و منجر به بهبود فعالیت حل‌کنندگی آن‌ها می‌شود (۳۰ و ۴۱). فلوگوپایت (به عنوان منبع پتاسیم) جزء میکاهای تری‌اکتاهیدرال می‌باشد و از ساختمان ضعیفی برخوردار است. با توجه به اینکه پتاسیم در میکاها توسط نیروهای الکترواستاتیک نگه‌داری می‌شود لذا آنیون حاصل از اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتری قادر به انحلال آلومینیوم ورقه اکتاهیدرال بوده و می‌تواند پتاسیم بین‌لایه‌ای را آزاد نماید. در میکاهای تری‌اکتا به دلیل فاصله کمتری که بین گروه‌های هیدروکسیل لایه اکتاهیدرال وجود دارد، پتاسیم بین لایه‌ها دارای پایداری کمی می‌باشد و لذا آزادسازی پتاسیم بیشتر اتفاق میافتد (۴۳). کاهش تدریجی انحلال پتاسیم در اثر افزایش مقدار فلوگوپیت را می‌توان به جذب و یا تثبیت دوباره پتاسیم رها شده از کانی در طول مدت زمان انکوباسیون نسبت داد (۳۱).

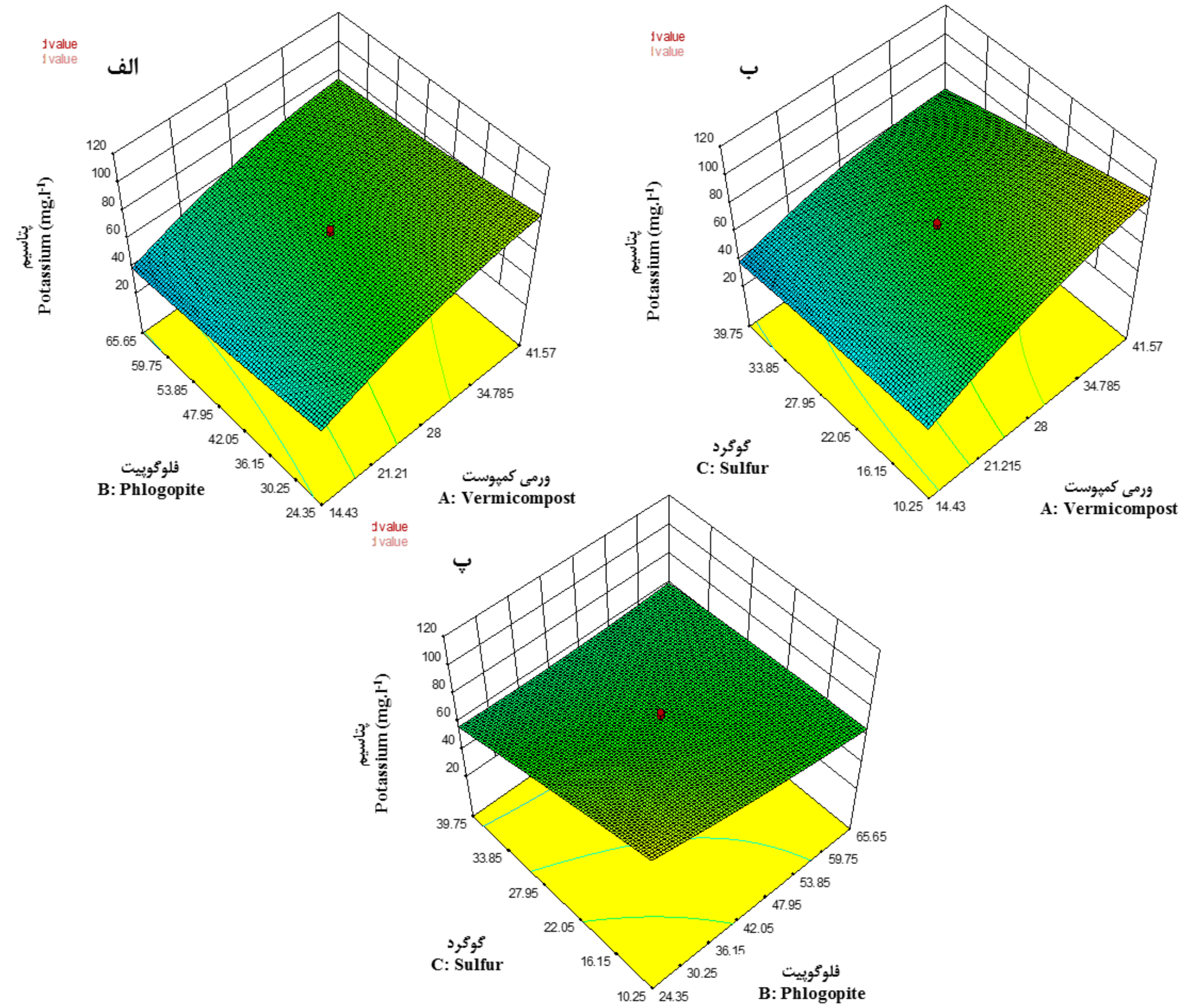
بر اساس پیش‌بینی شرایط بهینه برای انحلال پتاسیم مشاهده می‌شود که مقادیر ۴۱/۷۸ درصد ورمی‌کمپوست، ۲۴/۳۵ درصد فلوگوپیت و ۱۰/۲۵ درصد گوگرد منجر به بیشترین انحلال پتاسیم (۱۰۹/۲۷ میلی‌گرم بر لیتر) توسط باکتری *سودوموناس فلورسنس* می‌شود (شکل ۴).

نتیجه‌گیری

در این پژوهش اثر نسبت‌های مختلف ورمی‌کمپوست، فلوگوپیت (منبع پتاسیم) و گوگرد بر میزان انحلال و آزادسازی پتاسیم توسط *سودوموناس فلورسنس* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان‌دهنده‌ی تأثیر مطلوب ترکیب کودی استفاده شده (ورمی کمپوست + فلوگوپیت + گوگرد) بر توانایی حل‌کنندگی باکتری

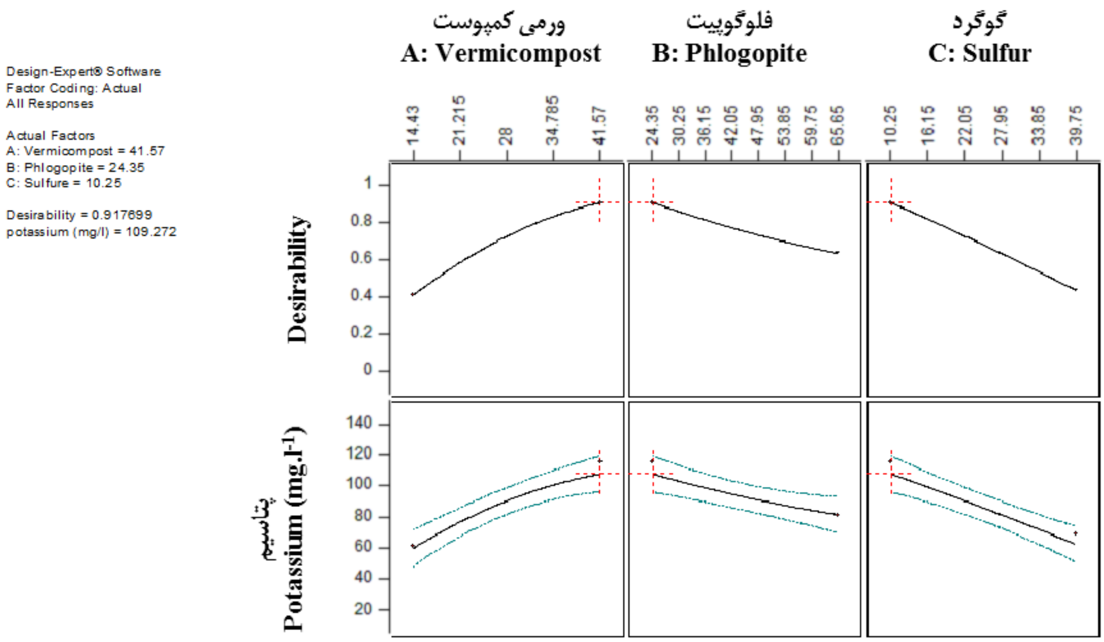
1- K- solubilizing microorganisms (KSMs)

سودوموناس فلورسنس در مقیاس آزمایشگاهی بود. بر اساس نتایج این پژوهش، ترکیب ۴۱/۷۸ درصد ورمی‌کمپوست، ۲۴/۳۵ درصد فلوگوپیت و ۱۰/۲۵ درصد گوگرد می‌تواند از طریق فراهم نمودن شرایط مطلوب برای فعالیت باکتری، کود زیستی پتاسیمی خوبی را ایجاد نماید که در کنار فعالیت‌های حل‌کنندگی باکتری، به‌دلیل وجود گوگرد، pH خاک را کاهش داده و از این طریق نیز منجر به افزایش فراهمی و پایداری عناصر غذایی در این خاک‌ها شود. پیشنهاد می‌شود کارآیی این ترکیب کودی (با استفاده از مقادیر بهینه مواد) در مقیاس گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نیز ارزیابی گردد.



شکل ۳- نمایش سه‌بعدی تغییرات مقدار پتاسیم در مقابل متغیرهای ورودی مدل طرح مرکب مرکزی

Figure 3– 3 dimensional present of K amount against central composite design variables



شکل ٤- بهینه‌سازی مقادیر پارامترهای ورودی مدل برای کسب بیشینه غلظت پتاسیم محلول

Figure 4– Optimization of input parameters of the model for obtaining maximum soluble potassium concentration

منابع

1- Adesemoye A.O., and Kloepper J.W. 2009. Plant–microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. Applied Microbiology and Biotechnology 85(1): 1-12.

2- Alikhani H.A., and Hemati A. 2014. Effect of Vermicompost Enrichment with Chemical Fertilizer and Bacterial Treatments on Humification and Acid Humic Properties. Agricultural Science and Sustainable Production 24: 113-125. (In Persian with English Abstract)

3- Almeida H.J., Pancelli M.A., Prado R.M., Cavalcante V.S., and Cruz F.J.R. 2015. Effect of potassium on nutritional status and productivity of peanuts in succession with sugar cane. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 15(1): 1-10.

4- Amanpour J., Salari D., Niaei A., Mousavi S.M., and Panahi P.N. 2013. Optimization of Cu/activated carbon catalyst in low temperature selective catalytic reduction of NO process using response surface methodology. Journal of Environmental Science and Health 48(8): 879-886.

5- Anonymous. 2006. Biofertilizer Manual, FNCA Biofertilizer Project Group. Japan Atomic Industrial Forum.

6- Archana D.S., Nandish M.S., Savalagi V.P., and Alagawadi A.R. 2013. Characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from rhizosphere soil. BIOINFOLET-A Quarterly Journal of Life Sciences 10(1): 248-257.

7- Ashrafi-Saeidlou S., and Rasouli-Sadaghiani M.H. 2017. Potassium release kinetics from K-bearing minerals in presence of silicate-solubilizing microorganisms. Iranian Journal of Soil and Water Research 3: 639-649. (In Persian with English Abstract)

8- Badr M.A., Shafei A.M., and Sharaf El-Deen S.H. 2006. The dissolution of K and P-bearing minerals by silicate dissolving bacteria and their effect on sorghum growth. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 2(1): 5-11.

9- Barin M., Sadeghi S., Rasouli-Sadaghiani M.H., Sepehr E., Dovlti B., and Vahedi R, 2018. Influence of k-solubilizing fungi on potassium release from silicate minerals and some growth indexes on Corn (*Zea mays* L.). Applied Soil Research 6(2): 96-108. (In Persian with English Abstract)

10- Benitez E., Nogales R., Elvira C., Masciandaro G., and Ceccanti B. 1999. Enzyme and earthworms activities during vermicomposting of carbaryl treated sewage sludge. Journal of Environmental Quality 28: 1099–1104.

11- Besharati H. 2001. Preparing appropriate medium for *Thiobacillus* and study of its interaction with VAM and grain yield of wheat. PhD Thesis, Tarbiat Modarres University. 212 p. (In Persian with English Abstract)

12- Besharati H., and Saleh Rastin N. 2000. Study of *Thiobacillus* bacterial inoculation effects along with sulfur to increase the absorption of phosphorus. Journal of Soil and Water Sciences 13(23): 1-39. (In Persian with English

Abstract)

13- Bin L. 1998. A study on how silicate bacteria GY92 dissolves potassium from illite. Acta Mineralogica Sinica 18(2): 234-237.

14- Box G.E., and Draper N.R. 2007. Response surfaces, mixtures, and ridge analyses. John Wiley & Sons.

15- Busato J.G., Lima L.S., Aguiar N.O., Canellas L.P., and Olivares F.L. 2012. Changes in labile phosphorus forms during maturation of vermicompost enriched with phosphorus-solubilizing and diazotrophic bacteria. Bioresource Technology 110: 390–395.

16- Chapman H.D., and Pratt P.F. 1978. Methods of analysis for soils, plants and waters. P. 30-43. Division of Agricultural Sciences. University of California, Berkeley, USA.

17- Dix N.J., and Webster J. 1995. Fungal Ecology. Cahpman & Hall, Cambridge, UK. 57p.

18- Etesami H., Emami S., and Alikhani H.A. 2017. Potassium solubilizing bacteria (KSB): Mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects A review. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 17(4): 897-911.

19- Gangoliya S.S., Gupta R.K., and Singh N.K. 2015. Phytase production through response surface methodology and molecular characterization of *Aspergillus fumigatus* NF191. Indian Journal of Experimental Biology 53: 350-355.

20- Girgis M.G.Z., Khalil H.M., and Sharaf M.S. 2008. In vitro evaluation of rock phosphate and potassium solubilizing potential of some Bacillus strains. Australian Journal of Basic and Applied Sciences 2(1): 68-81.

21- Glick B.R. 2012. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Scientifica 2012: 1-15.

22- Han H.S., and Lee K.D. 2006. Effect of co-inoculation with phosphate and potassium solubilizing bacteria on mineral uptake and growth of pepper and cucumber. Plant, Soil and Environment 52(3): 130.

23- Kaushik P., Yadav Y.K., Dilbaghi N., and Garg V.K. 2008. Enrichment of vermicompost prepared from cow dung spiked solid textile mill sludge using nitrogen fixing and phosphate solubilizing bacteria. Environmentalist, 28:283–287.

24- Khoshrou B. Sarikhani M.R., and Aliasgharzad N. 2017. Application and non-application of sulfur in the formulation of *Pseudomonas fluorescens* phosphatic microbial fertilizer on Corn (*Zea mays* L.). Agricultural Science and Sustainable Production 27: 119-136.

25- Lian B., Wang B., Pan M., Liu C., and Teng H.H. 2008. Microbial release of potassium from K-bearing minerals by thermophilic fungus *Aspergillus fumigatus*. Geochimica et Cosmochimica Acta 72(1): 87-98.

26- Liu W., Xu X., Wu X., Yang Q., Luo Y., and Christie P. 2006. Decomposition of silicate minerals by Bacillus mucilaginosus in liquid culture. Environmental Geochemistry and Health 28(1-2): 133-140.

27- Meena V.S., Maurya B.R., and Bahadur I. 2014. Potassium solubilization by bacterial strain in waste mica. Bangladesh Journal of Botany 43(2):235–237.

28- Meena V.S., Maurya B.R., Verma J.P., Aeron A., Kumar A., Kim K. and Bajpai V.K. 2015. Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. Ecological Engineering 81: 340-347.

29- Mirseyed-Hosseini H., Gerdelidani-Fathi A., and Jabalameli M. 2017. Effects of elemental and bentonite sulfur on sulfur and phosphorous availability in calcareous soil and corn growth characteristics. Iranian Journal of Soil Research 1: 61-73. (In Persian with English Abstract)

30- Nancarrow L., Taylor J.H. 1998. The Worm Book: The Complete Guide to Worms in Your Garden. Ten Speed Press. 152p.

31- Norouzi S., Khademi H., and Shirvani M. 2012. The kinetics of K release from muscovite and phlogopite with organic acids. Journal of Soil and Water Research 42: 163-173. (In Persian with English Abstract)

32- Parmar P., and Sindhu S.S. 2013. Potassium solubilization by rhizosphere bacteria: influence of nutritional and environmental conditions. Journal of Microbiological Research 3(1): 25-31.

33- Pradhan N., and Sukla L.B. 2006. Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. African Journal of Biotechnology 5(10): 850-854.

34- Prasad M.P. 2014. Optimization of fermentation conditions of phosphate solubilizing bacteria- a potential bio fertilizer. Merit Research Journal of Microbiology and Biological Science 2(2): 031-035.

35- Ravindran B., Dinesh S.L., John Kennedy L., and Sekaran G. 2008. Vermicomposting of solid waste generated from leather industries using epigeic earthworm *Eisenia fetida*. Applied Biochemical Biotechnology 151: 480–488.

36- Rodriguez H., and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17:319-339.

37- Saha M., Maurya B.R., Meena V.S., Bahadur I., and Kumar A. 2016. Identification and characterization of potassium solubilizing bacteria (KSB) from Indo-Gangetic Plains of India. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 7: 202-209.

38- Senesi N., Miano T. M., and Brunetti G. 1996. Humic-like substances in organic amendments and effects on native soil humic substances. In Humic substances in terrestrial ecosystems. P. 531-593. Elsevier Science BV.

39- Sharmila M., Ramanand K., and Sethunathan N. 1989. Effect of yeast extract on the degradation of

organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. Canadian Journal of Microbiology 35(12): 1105-1110.

40- Sheng X.F., and He L.Y. 2006. Solubilization of potassium-bearing minerals by a wild-type strain of *Bacillus edaphicus* and its mutants and increased potassium uptake by wheat. Canadian Journal of Microbiology 52(1): 66-72.

41- Shilpa M.E., and Brahmaprakash G.P. 2016. Amendment of carrier with organic material for enhancing shelf life of microbial consortium. Journal of Pure and Applied Microbiology 10(4): 2835-2842.

42- Somasegaran P., and Hoben H.J. 1994. Preparing a Range of Carrier Materials and Producing Inoculants. In: Handbook for Rhizobia. Springer, New York.

43- Sparks D.L., and Huang P.M. 1985. Physical chemistry of soil potassium. P. 201-276. Potassium in Agriculture. Soil Science Society of America, Madison.

44- Sparks D.L. 1987. Potassium dynamics in soils. P. 1-63. In Advances in soil science. Springer, New York.

45- Swetha S., Varma A., and Padmavathi T. 2014. Statistical evaluation of the medium components for the production of high biomass, a-amylase and protease enzymes by *Piriformospora indica* using Plackett–Burman experimental design. Biotechnology 4: 439–445.

46- Whitelaw M.A. 1999. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. P. 99-151. In: Advances in Agronomy, Academic Press.

47- Whitelaw M.A. 2007. Growth promotion of plants inoculated with phosphate solubilizing fungi. Advances in Agronomy 69: 99-151.

48- Witek-Krowiak A., Chojnacka K., Podstawczyk D., Dawiec A., and Pokomeda K. 2014. Application of response surface methodology and artificial neural network methods in modelling and optimization of biosorption process. Bioresource Technology 160: 150-160.

49- Xiao Y., Wang X., Chen W., and Huang Q. 2017. Isolation and identification of three potassium-solubilizing bacteria from rape rhizospheric soil and their effects on ryegrass. Geomicrobiology Journal 34(10): 873-880.

50- Zord C., Senbayram M., and Peiter E. 2014. Potassium in agriculture – status and perspective. Journal of Plant Physiology 171:656–659.

Journal of Water and Soil
Vol. 34, No. 3, July-August 2020, p. 661-673

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۴، شماره ۳، مرداد – شهریور ۱۳۹۹، ص. ۶۷۳-۶۶۱

Evaluation of Different Ratios of Biofertilizer Components Impact on Potassium Dissolution by *Pseudomonas fluorescens*

S. Ashrafi-Saeidlou[1]- A. Samadi[2]- M.H. Rasouli-Sadaghiani[3]*- M. Barin[4]- E. Sepehr[5]
Received: 02-09-2019
Accepted: 09-02-2020

Introduction: Potassium (K) is abundant in soil, however, only 1 to 2 % of Potassium is available to plants. Depending on soil type, 90 to 98% of soil K is in the structure of various minerals such as feldspar (orthoclase and microcline) and mica (biotite and muscovite). About 1 to 10 % of soil K, in the form of non-exchangeable K, is trapped between the layers of certain types of clay minerals. The concentration of soluble K, which is directly taken up by plants and microbes in the soil and is exposed to leaching, varies from 2 to 5 mg l^{-1} in agricultural soils. Imbalanced use of chemical fertilizers, a significant increase of crop yield (depletion of soil soluble K), and the removal of K in the soil system result in a large rate of K fixation in the soil. As a result, K deficiency has been reported in most plants. The annual increase in the price of K fertilizers and the destructive effects of them on the environment have made it necessary to find a solution for the use of indigenous K of soil. The use of biofertilizers containing beneficial microorganisms is one of these strategies. Although K solubilizing bacteria can be an alternative and reliable technology for dissolving insoluble forms of K, lack of awareness among farmers, the slow impact of K biofertilizers on yield, less willingness of researchers to develop K biofertilizers technology and deficiencies of technology in respect to carrier suitability and proper formulation, are the major reasons for why potassium solubilizing microorganisms and K biofertilizers draw low attention.

Material and Methods: The purpose of this study was modeling and evaluating the effects of different vermicompost, phlogopite and sulfur ratios on the solubility and release of K by *Pseudomonas fluorescens* and indicating the optimized levels of these variables for efficient biofertilizer preparation. 20 experiments were carried out using the response surface methodology (RSM) based on the central composite design and the effect of different values of vermicompost, phlogopite and sulfur variables, in the four coded levels (+α, +1, 0, -1 and -α), was evaluated on K dissolution. The applied vermicompost, phlogopite and sulfur in the experiment were ground and filtered through a 140 mesh sieve and their water holding capacity were determined. According to experimental design, different amounts of mentioned materials were combined and samples were sterilized in autoclave. The required amount of water along with 1 ml of bacterial inoculant were added to the samples. The samples were kept in incubator for 2 months. At the end of experiment, amount of soluble K were measured by the flame photometer.

Results: The analysis of variance (ANOVA) depicted the reliable performance of the central composite predictive model of K dissolution (R^2= 0.949 and RMSE=0.8). Based on the results, the interaction of vermicompost with sulfur ($p < 0.038$) and the interaction of phlogopite with sulfur ($p < 0.0083$) were relatively high and significant. Sensitivity analysis of the central composite design revealed that the vermicompost (X_1), phlogopite (X_2) and sulfur (X_3) had positive and negative impact on potassium dissolution, respectively. Therefore, when sulfur content increased to 91.70%, K dissolution decreased to around 31.61%. According to the prediction under optimized condition, maximum potassium dissolution was obtained at the presence of 41.78, 24.35 and 10.25% of vermicompost, phlogopite and sulfur, respectively.

Conclusion: The results indicated that the applied fertilizer composition (vermicompost + phlogopite + sulfur) had a desirable impact on *Pseudomonas fluorescens* solubilizing ability on a laboratory scale. Due to the fact that Iran soils are often calcareous, there are high amounts of insoluble and unavailable nutrients. Under these unsuitable conditions, the application of these nutrients chemical fertilizers cannot reduce deficiencies. Therefore, we must use the ability of efficient microorganisms to dissolve and mobilize soil native elements. A combination of 41.78% vermicompost, 24.35% phlogopite and 10.55% sulfur could create a proper potassium biofertilizer by providing favorable conditions for bacterial activity. Along with solubilizing activities of

1, 2, 3, 4 and 5- Ph.D. Student of Soil Science, Professors, Assistant Professor and Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: m.rsadaghiani@urmia.ac.ir)
DOI: 10.22067/jsw.v34i3.82161

bacteria, the presence of sulfur reduces soil pH and thereby nutrients availability and stability increase in these soils. Because of its acidity, sulfur has a significant effect on nutrients dissolution such as phosphorus, nitrogen and potassium, and micronutrients. On the other hand, the presence of vermicompost in this fertilizer, while meeting the carbon and energy requirements of bacteria and acting as a suitable carrier, improves the physicochemical properties of the soil, increases the biodiversity of the microbial community and, as a result, promotes the soil quality and health. The evaluation of this fertilizer composition efficiency (using optimal amounts of materials) at the greenhouse and field scales is suggested.

Keywords: Biofertilizer, Modeling, Response Surface methodology, Vermicompost